

Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el análisis del perfil de ácidos micólicos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

María I. Múnera ¹, Elsa M. Zapata ¹, Lucero Castrillón ², Gloria I. Mejía ², Jaime Robledo ²

Resumen

Con el fin de validar una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, se evaluaron 164 aislamientos de *Mycobacterium* spp. entre octubre de 1994 y octubre de 1995 en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Todas las cepas provenían de pacientes y pertenecían a la colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología de la CIB y fueron identificadas tanto por las pruebas bioquímicas tradicionales como por HPLC. Las pruebas bioquímicas se consideraron como el estándar de oro. Según éstas, 80 cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 84 como diferentes a *M. tuberculosis*. Dos cepas de *M. tuberculosis* fueron identificadas en forma incorrecta por HPLC, una de ellas fue identificada como *M. bovis*-BCG y la otra como *M. intracellulare*. La sensibilidad de HPLC para la identificación de *M. tuberculosis* fue de 97,5%, la especificidad fue de 100%, el valor predictivo positivo de la prueba de 100% y el valor predictivo negativo de 97,7%.

Summary

In order to validate a high-pressure liquid chromatography (HPLC) technique to identify *Mycobacterium tuberculosis*, 164 *Mycobacterium* spp. strains were evaluated between October 1994 and October 1995 at the Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). All strains came from patients and belong to CIB's Bacteriological Laboratory's collection of strains and were identified by traditional biochemical tests as well as HPLC. The biochemical tests were considered to be the gold standard. According to these, 80 strains were identified as being *M. tuberculosis* and 84 as being different to *M. tuberculosis*. Two strains of *M. tuberculosis* were identified incorrectly by HPLC; one of these was identified as being *M. bovis*-BCG and the other as *M. intracellulare*. The test's sensitivity was 97.5%, the specificity 100%, the positive predictive value (PPV) 100% and the negative predictive value (NPV) 97.7%.

En el diagnóstico actual de la tuberculosis (TBC), la principal limitación del cultivo es la lentitud del crecimiento de *M. tuberculosis*. Con el método tradicional de cultivo, el tiempo necesario para el aislamiento del germen es de 3 a 4 semanas y la identificación tarda 3-6 semanas más. Si se tiene en cuenta que un

factor clave en el control de la tuberculosis es el diagnóstico precoz de todos los casos, surge la necesidad de contar con técnicas de laboratorio rápidas, sensibles y específicas para el aislamiento inicial y la identificación (1-5).

En los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos para el aislamiento e identificación de

¹ Sección de Farmacología y Laboratorio Clínico y ² Sección de Bacteriología, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín.

micobacterias que buscan reducir el tiempo necesario para confirmar el diagnóstico (6-8). En la práctica clínica, la identificación de la especie tiene importancia porque, en el caso de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*, son a menudo resistentes a la terapia utilizada para el tratamiento de infecciones por *M. tuberculosis* (7).

Con el sistema radiométrico BACTEC 460®, por ejemplo, se pueden diferenciar rápidamente los miembros del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias. Con este sistema el tiempo promedio de aislamiento para el complejo *M. tuberculosis* es de 15,5 días, mientras que con el sistema tradicional es de 25,6 días (7).

Las técnicas de PCR permiten el diagnóstico en pocas horas con alta sensibilidad y especificidad (60-100%). Infortunadamente, este método tiene aún dificultades ya que no diferencia entre infección aguda, reactivación, foco inactivo o la presencia de bacilos muertos y los falsos positivos pueden ser frecuentes. Lo anterior limita su uso en los laboratorios de diagnóstico (7-10,18).

El análisis de los ácidos micólicos, componentes lipídicos de la pared de las micobacterias, por cromatografía líquida de alta presión acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV) es un método rápido de identificación a partir de cultivos ya aislados. Permite la detección a partir de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) y, por tanto, puede emplearse a partir del cultivo inicial, es decir, en 2-4 semanas es posible obtener la identificación (2,3,11).

Los patrones cromatográficos de los ácidos micólicos son específicos para especie, lo que permite la identificación de las distintas especies de micobacterias con un solo procedimiento de laboratorio que tarda 2 horas (proceso de extracción) y 12 minutos (separación cromatográfica). En contraste, las pruebas bioquímicas utilizadas tradicionalmente, requieren subcultivos lo cual implica, por lo menos, cuatro semanas adicionales. Además, como mínimo, se recomienda realizar tres pruebas distintas para la identificación de *M. tuberculosis*: nitritos, catalasa y niacina.

En este estudio, se pretende comparar el método tradicional de identificación de *M. tuberculosis* con la metodología por HPLC-UV y establecer la sensibilidad y especificidad de este método en nuestro medio. La utilización de este método tiene como propósito reducir el tiempo de diagnóstico de la TBC que permita el inicio precoz de la terapia y reduzca los costos de atención.

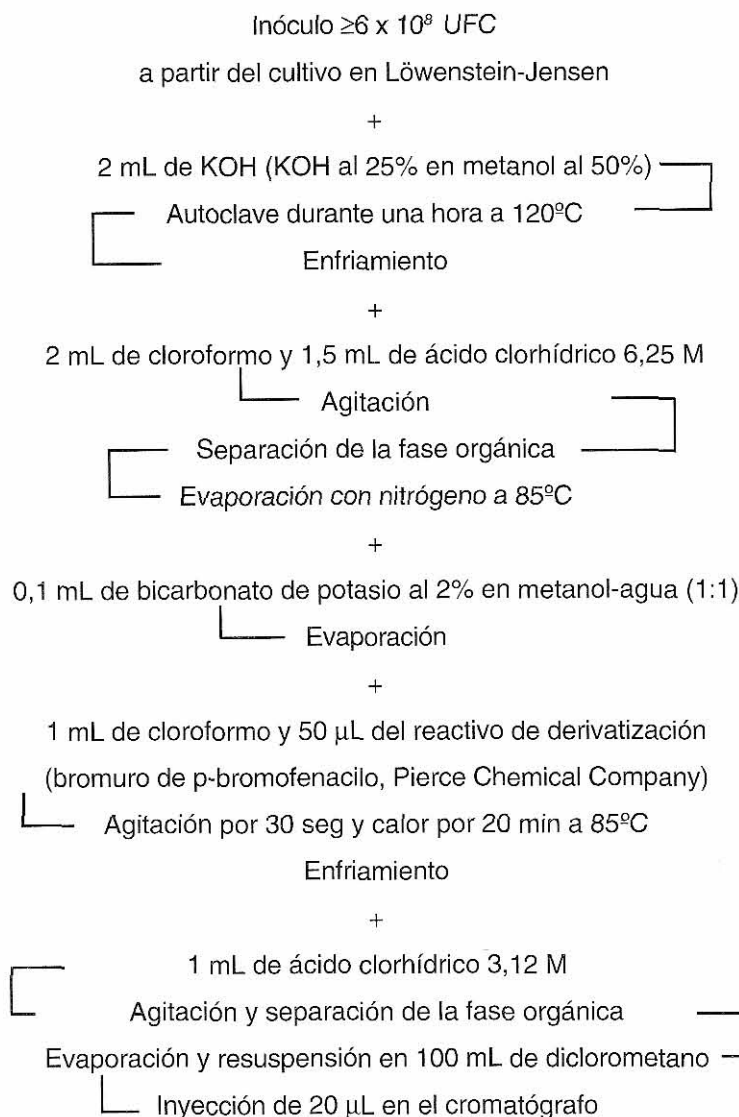
Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de crecimiento. Entre octubre de 1994 y octubre de 1995 se analizaron 164 aislamientos de *Mycobacterium* spp. provenientes de pacientes y pertenecientes a la colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología de la CIB. Las cepas fueron sembradas en Löwenstein-Jensen e incubadas a 35°C por 2 semanas.

Identificación. Todos los aislamientos fueron identificados tanto por los métodos estándar tradicionales (velocidad de crecimiento, morfología de las colonias, pigmentación y perfil bioquímico) como por HPLC. La identificación definitiva por pruebas bioquímicas se consideró como el estándar de oro.

Extracción de ácidos micólicos. Para la extracción de los ácidos micólicos, se utilizó la técnica reportada por Buttler y col. (12) la cual se muestra esquemáticamente en la figura 1.

Condiciones cromatográficas. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión *Beckman System Gold* (Beckman, San Ramón, CA, USA) con módulo de solventes 126 y módulo detector 166, ambos programables, equipado con un inyector manual Beckman, modelo 210A, y un integrador Hewlett Packard, modelo HP3395, (Hewlett Packard, Alemania). El detector se ajustó a una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó una columna Nova-Pak C18 3,9 x 75 mm ® (Waters, USA). La fase móvil fue metanol en la línea A y diclorometano en la línea B (Merck, Darmstadt, Alemania). Se programó un gradiente de concentración de solventes así: 20% de B en el primer minuto, 60% de B durante 11 minutos y 2% de B durante 30 seg a partir de los 12 min. La velocidad de flujo de la fase móvil

Figura 1. Diagrama de flujo del método de extracción de ácidos micólicos.

fue de 2,5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 20°C.

Para la identificación de los picos se obtuvo el tiempo de retención relativo (TRR) mediante la diferencia entre el tiempo de retención (TR) del estándar interno (p-bromofenacilo) (Pierce, Rockford, Illinois, USA) y el TR del pico de interés. Con el TRR de $1,89 \pm 0,03$, se identificó el pico 7 y, a partir de allí, se enumeraron los demás picos (figura 2) (15).

Una vez enumerados los picos, se obtuvo la relación de alturas de los picos 3/5 y 4/7. Si la relación de las alturas de los picos 3/5 era menor de 0,25 y la de los picos 4/7 menor de 0,5 se trataba de *M. tuberculosis*, según lo descrito por Butler y col. (15).

Resultados

Con las condiciones cromatográficas anotadas, se logró la extracción de los ácidos micólicos

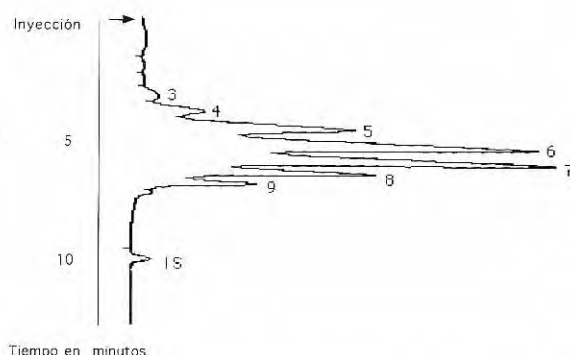


Figura 2. Cromatograma característico de *M. tuberculosis*; obsérvese la presencia de un solo grupo de 7 picos. ISI: estándar interno

sin interferencias. Cada análisis duró 12 min. Los ésteres de ácidos micólicos eluyeron en un tiempo entre $7,7 \pm 0,09$ y $9,3 \pm 0,11$ min, con un patrón de un solo grupo de picos y el estándar interno en $10,7 \pm 0,16$ min. El cromatograma característico de *M. tuberculosis* muestra un solo grupo de 7 picos tal como aparece en la figura 2. De éstos, los más importantes para la correcta identificación son el 3, 4, 5 y 7, cuya relación de alturas permite definir el complejo *M. tuberculosis*. El coeficiente de variación (CV) para los TRR de todos los picos fue menor de 4%. El cuadro 1 presenta el promedio, la desviación estándar y los coeficientes de variación de los TRR para todos los picos.

Según las pruebas bioquímicas, 80 cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 84 como diferentes a *M. tuberculosis* (cuadro 2). Dos cepas de *M. tuberculosis* fueron identificadas en forma incorrecta por HPLC, una

Cuadro 1. Lista de 84 especies de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* según identificación bioquímica, CIB, 1994-1995.

Especie	Número cepas	Especie	Número cepas
<i>M. avium-intracellulare</i>	16	<i>M. bovis</i>	2
<i>M. fortuitum</i>	15	<i>M. smegmatis</i>	2
<i>M. terrae</i>	9	<i>M. vaccae</i>	2
<i>M. goodii</i>	7	<i>M. parafortuitum</i>	2
<i>M. chelonae</i>	6	<i>M. szulgai</i>	2
<i>M. flavescens</i>	5	<i>M. xenopi</i>	1
<i>M. marinum</i>	4	<i>M. gastri</i>	1
<i>M. phlei</i>	3		

Cuadro 2. Tiempos de retención de los picos característicos de 78 cepas de *M. tuberculosis*.

Pico	3	4	5	6	7	8	9
n	78	78	78	78	78	78	78
Media	2,93	2,68	2,41	2,15	1,89	1,65	1,43
DE	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06
CV	1,7	1,7	1,2	1,4	1,6	1,8	4,0

DE: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

de ellas se identificó como *M. bovis*-BCG y la otra como *M. intracellulare*.

La sensibilidad de HPLC para la identificación de *M. tuberculosis* fue de 97,5%, la especificidad de 100%, el valor predictivo positivo (VPP) de 100% y el valor predictivo negativo (VPN) de 97,7%.

Discusión

La identificación de *M. tuberculosis* por HPLC fue un método rápido, reproducible, sensible y específico cuando se comparó con las pruebas bioquímicas. Mientras que las últimas requerían cuatro pruebas (tiempo de crecimiento superior a 7 días, niacina y nitritos positivos y catalasa negativa) y un tiempo mínimo de 1 mes para confirmar la identificación, HPLC solo necesitó un proceso de extracción que tardó 2 horas y la separación cromatográfica que tomó 12 minutos. En síntesis, el método cromatográfico puede reducir el tiempo de identificación en 4 a 6 semanas. Ello implica la iniciación más precoz de la terapia y el más rápido control de la diseminación de la infección.

Cuando se compara el método de HPLC-UV para la identificación de *M. tuberculosis* a partir del cultivo, con los métodos clásicos, dicha identificación es correcta en más del 98% de los casos según diferentes autores. Glickman y col., en 1994, lograron la identificación de diferentes aislamientos de *M. tuberculosis*, utilizando un programa de reconocimiento de patrones de picos obtuvieron una concordancia entre el método de HPLC y el método tradicional del 99% (13). Tanto en el estudio de Guthertz y col. como en el de Butler se logró una concordancia entre los 2 métodos de 100% (14, 15).

Cuadro 3. Identificación correcta por HPLC de *M. tuberculosis* según diferentes autores.

Autor (Ref.)	No. cepas evaluadas	No. confir. HPLC	Concor. (%)
13	649	648	99
14	122	122	100
15	319	319	100
CIB	82	80	98

El cuadro 3 presenta una comparación entre los tres estudios mencionados y el presente trabajo e incluye el número de cepas evaluadas, el número confirmado por HPLC y la concordancia entre los métodos.

Actualmente, en algunos de los laboratorios de referencia a nivel mundial, se utiliza de rutina la identificación de micobacterias por HPLC-UV (13-16). Para la interpretación más ágil, versátil y exacta de los cromatogramas ya se dispone de un programa de computador que reconoce los patrones cromatográficos (14).

Adicionalmente, el método de HPLC ha sido mejorado últimamente mediante la utilización de un detector de fluorescencia a cambio del ultravioleta. De esta forma, la sensibilidad se incrementa 200 veces, permitiendo la identificación de micobacterias directamente a partir de muestras clínicas o de cultivos con escaso crecimiento (17).

Una ventaja adicional del método HPLC es que permite diferenciar a las micobacterias de otros *microorganismos que contienen ácidos micólicos* en su pared tales como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona* y *Corynebacterium* (13).

Referencias

1. Haas D. Mycobacterial disease. In: Mandell G, Douglas G, Bennett J, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th. ed. New York: Churchill Livingstone; 1995:2213-43.
2. Nolte FS. *Mycobacterium*. In: Manual of clinical microbiology. 6th. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1995:400-35.
3. Master RN. Mycobacteriology. In: Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1992:3.0.1-3.16.3.
4. Ochoa LC, et al. Series cronológicas de salud. Medellín: Dirección Seccional de Salud de Antioquia; 1994.
5. Estrada S. Diagnóstico y manejo terapéutico del paciente con SIDA-TBC. Boletín Epidemiológico de Antioquia 1994;33-41.
6. Kaufman S, van Embden J. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. Trends in Microbiology 1993;1:2-5.
7. Pfaller MA. Application of new technology to the detection, identification and antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria. Clin Microbiol Infect Dis 1994;329-37.
8. Sepkowitz KA. Tuberculosis at the end of the twentieth century. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13: 902-7.
9. Barnes PF. Tuberculosis in the 1990s. Ann Intern Med 1993;119:400-10.
10. Kathleen D, et al. Diagnosis of tuberculosis: present and future. Seminars in Respiratory Infections 1989; 4:171-81.
11. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:961-79.
12. Butler RW, Kilburn JO. Identification of major slowly growing pathogenic Mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high performance liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol 1988; 26:50-3.
13. Glickman SE, Kilburn JO, et al. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. J Clin Microbiol 1994;32:740-5.
14. Guthertz, LS, Lim, SD, et al. Curvilinear gradient high performance liquid chromatography for identification of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1993;31: 1876-81.
15. Butler RW, et al. Identification of Mycobacteria by high performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1991;29:2468-72.
16. Thibert L, Lapierre S. Routine application of high performance liquid chromatography for identification of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1993;31:1759-63.
17. Jost KC, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. J Clin Microbiol 1995;33: 1270-7.
18. Doern GV. Diagnostic mycobacteriology: where are we today? J Clin Microbiol 1996;33:1873-6.